

**B2****2 706 486**

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **93 07241**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 15/12 , 7/01 , A 61 K 31/70 , 48/00

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 16.06.93.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 23.12.94 Bulletin 94/51.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : RHONE-POULENC RORER (S.A.) —  
FR.

⑦2 Inventeur(s) : Schweighofer Fabien et Tocque Bruno.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Rhône-Poulenc Rorer S.A. Direction  
Brevets.

⑤4 Séquences nucléiques, vecteurs les contenant, compositions pharmaceutiques et utilisations thérapeutiques.

⑤7 La présente invention concerne des séquences nucléiques, les vecteurs les contenant, et leurs utilisations thérapeutiques, notamment en thérapie génique. Plus particulièrement, la présente invention concerne des séquences nucléiques comprenant un gène codant pour une protéine intracellulaire de liaison (PIL), et leur utilisation en thérapie génique, éventuellement incorporées à des vecteurs d'expression appropriés.

FR 2 706 486 - A1



SEQUENCES NUCLEIQUES, VECTEURS LES CONTENANT, COMPOSITIONS  
PHARMACEUTIQUES ET UTILISATIONS THERAPEUTIQUES

La présente invention concerne des séquences nucléiques, les vecteurs les contenant, et leurs utilisations thérapeutiques, notamment en thérapie génique. Plus  
5 particulièrement, la présente invention concerne des séquences nucléiques comprenant un gène codant pour une protéine intracellulaire de liaison (PIL), et leur utilisation en thérapie génique, éventuellement incorporées à des vecteurs d'expression appropriés.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anormalité (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique  
10 dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. A cet égard, différentes techniques de transfection et de transfert de gènes ont été décrites dans la littérature (Cf Roemer et Friedman, Eur. J. Biochem. 208 (1992) 211). Jusqu'à  
15 aujourd'hui, les approches proposées dans l'art antérieur pour la thérapie génique consistent à transférer des gènes codant pour des polypeptides actifs impliqués dans des maladies génétiques (hormones, facteurs de croissance, etc), des gènes antisens, ou des peptides antigéniques pour la réalisation de vaccins. La présente invention concerne une nouvelle approche de la thérapie génique, consistant à transférer et à  
20 exprimer dans une cellule (ou un tissu) cible un peptide intracellulaire capable d'interagir avec des composants cellulaires et ainsi d'interférer avec des fonctions cellulaires. La présente invention repose plus particulièrement sur la mise en évidence qu'il est possible d'exprimer in vivo des anticorps modifiés qui restent dans le compartiment intracellulaire, et qui peuvent contrôler certaines fonctions cellulaires.  
25 L'invention repose également sur la mise en évidence qu'il est possible de cloner des séquences d'ADN codant pour de tels anticorps intracellulaires dans des vecteurs, notamment viraux, pour une utilisation en thérapie génique.

L'utilisation d'anticorps en thérapie humaine permet, en général, de cibler et neutraliser des complexes biologiques circulants et/ou localisés à la surface des  
30 cellules, en entraînant une cascade d'événements gérés par le système immunitaire qui conduit à leur élimination. Cependant, dans beaucoup de cas, dont les cancers ou les maladies dues par exemple à des virus, cette approche est stérile car l'antigène responsable de la dérégulation des cellules atteintes est inaccessible aux anticorps

injectés. La présente invention offre une nouvelle approche thérapeutique particulièrement avantageuse, consistant à faire produire de manière continue et intracellulaire des anticorps ou agents thérapeutiques dont la liaison à leur épitope décroît et/ou annule la dérégulation.

5           La possibilité d'exprimer de manière recombinante des anticorps a déjà été décrite dans la littérature. Ainsi, le brevet EP 88994 décrit l'expression in vitro et la purification de régions variables de chaînes lourdes ou légères d'anticorps. De même, le brevet US 4,946,778 décrit l'expression in vitro de séquences d'ADN codant pour  
10 des anticorps modifiés composés de régions variables de chaînes lourde et légère d'un anticorps reliées par un linker. Cependant, les anticorps décrits dans ce brevet sont inactifs, et généralement synthétisés sous forme de corps d'inclusion insolubles. Les anticorps doivent donc être purifiés puis soumis à des traitements chimiques (dénaturation, renaturations, etc) pour recouvrer une activité. La présente invention démontre la possibilité d'utiliser de telles séquences d'ADN pour l'expression  
15 directement in vivo d'anticorps intracellulaires actifs. La présente invention démontre ainsi la possibilité d'utiliser de telles séquences d'ADN codant pour des anticorps intracellulaires, sous le contrôle de régions permettant leur expression dans les cellules mammifères, pour une thérapie génique, notamment chez l'homme. Cette nouvelle approche permet donc de cibler des composants cellulaires non accessibles par les  
20 méthodes classiques de vaccination. De plus, cette approche n'implique pas le développement d'une réponse immunitaire, mais agit intracellulairement.

          Un premier objet de l'invention réside donc dans une séquence d'acides nucléiques comprenant un gène codant pour une protéine intracellulaire de liaison (PIL) sous le contrôle de régions permettant son expression dans les cellules  
25 mammifères.

          L'invention concerne également des vecteurs contenant une séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-dessus. Plus particulièrement, les vecteurs de l'invention sont d'origine virale, tels que les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associés, le virus de l'herpès, le virus de la vaccine, le virus HSV, etc.

30           L'invention concerne également l'utilisation de ces séquences d'acides nucléiques ou de ces vecteurs pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement chirurgical et/ou thérapeutique du corps humain ou animal.

Elle concerne aussi toute composition pharmaceutique comprenant un vecteur, notamment viral, ou une séquence d'acides nucléiques tels que définis ci-dessus.

Au sens de la présente invention, le terme protéine intracellulaire de liaison (PIL) désigne toute protéine ou fragment de protéine capable de reconnaître un composant de la cellule dans laquelle elle est exprimée, et d'interagir de manière sélective et affine avec celui-ci. Il peut s'agir d'interactions chimiques covalentes ou non covalentes. L'interaction avec le composant cellulaire (protéines, lipides, acides aminés, ARNm, ARNt, ARNr, ADN, etc) permet d'agir sur une fonction cellulaire dans laquelle est impliqué ledit composant, et ainsi de contrôler (stimuler, ralentir, inhiber) cette fonction.

Préférentiellement, les PIL selon l'invention sont constituées par des molécules dérivées d'anticorps ou ayant des propriétés de liaison comparables à celles d'un anticorps. En particulier, il s'agit de protéines ayant une sélectivité et une affinité suffisantes pour permettre une interaction in vivo ayant un effet neutralisant sur l'antigène. Ces molécules sont désignées dans ce qui suit anticorps intracellulaires, en raison de leurs propriétés et de leur localisation.

Les anticorps, molécules de la superfamille des immunoglobulines, sont synthétisés naturellement (essentiellement par les lymphocytes B) sous forme de protéines sécrétées. Ils sont donc libérés dans les compartiments extracellulaires (système circulatoire) où ils exercent leur activité (reconnaissance et liaison aux antigènes non-soi). Il a maintenant été montré qu'il est possible d'exprimer in vivo des gènes modifiés codant pour des anticorps intracellulaires, sans affecter les propriétés de spécificité et d'affinité des anticorps. Les séquences d'acides nucléiques selon l'invention, qui codent pour des anticorps intracellulaires, comprennent donc un gène d'anticorps modifié de façon à ce que l'anticorps ne soit pas sécrété. En particulier, le gène de l'anticorps est généralement modifié par délétion ou mutation des séquences responsables de sa sécrétion. Les PIL selon l'invention peuvent notamment être constituées de fragments d'anticorps, et par exemple de fragments Fab ou F(ab)<sup>2</sup> qui portent les domaines de liaison de l'antigène. L'utilisation de ce type d'anticorps intracellulaire implique cependant l'expression d'une séquence d'acides nucléiques comprenant plusieurs gènes codant respectivement pour les régions lourdes et légères de ces fragments, et elle implique également que ces chaînes s'assemblent correctement in vivo. Pour cette raison, une forme particulièrement avantageuse d'anticorps intracellulaires utilisables dans le cadre de l'invention est constituée d'un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne légère d'un anticorps

relié par un linker peptidique à un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne lourde d'un anticorps. L'utilisation de ce type d'anticorps intracellulaire, désigné ScFv, est intéressante car ils sont exprimés par un gène unique. La construction de séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps  
5 modifiés selon l'invention est illustrée dans les exemples.

Par ailleurs, les séquences d'acides nucléiques codant pour les anticorps intracellulaires selon l'invention peuvent également être modifiées par voie chimique, enzymatique ou génétique, en vue de générer des anticorps intracellulaires stabilisés, et/ou multifonctionnels, et/ou de taille réduite, et/ou dans le but de favoriser leur  
10 localisation dans tel ou tel compartiment intracellulaire. Ainsi, les séquences d'acides nucléiques de l'invention peuvent comprendre des séquences codant pour des peptides de localisation nucléaire (NLS). En particulier, il est possible de fusionner les séquences de l'invention avec la séquence codant pour le NLS du virus SV40, dont la séquence peptidique est la suivante : MPKKKRK (Kalderon et al, Cell 39 (1984) 499).

15 Comme indiqué plus haut, les séquences d'acides nucléiques selon l'invention comprennent des séquences permettant l'expression du ou des gène(s) codant pour les PIL dans les cellules mammifères. Généralement, les gènes PIL sont donc placés sous le contrôle de régions promotrices de la transcription et de la traduction, fonctionnelles dans la cellule mammifère dans laquelle l'expression est recherchée. Il peut s'agir de  
20 séquences homologues vis-à-vis de ladite cellule, c'est à dire de séquences responsables naturellement de l'expression de gènes dans ladite cellule. Il peut également s'agir de séquences d'origine différente, c'est à dire de séquences responsables de l'expression de protéines dans d'autres types cellulaires, de séquences responsables de l'expression d'anticorps dans les conditions naturelles, de séquences  
25 d'expression virales, par exemple présentes dans un vecteur dans lequel les séquences de l'invention sont incorporées, ou encore de séquences synthétiques ou semi-synthétiques.

S'agissant d'un usage pour l'homme, de nombreux promoteurs fonctionnels ont été décrits dans la littérature, tels que par exemple les promoteurs viraux CMV, SV40, E1a, MLP, LTR, etc. Des promoteurs cellulaires, tels que par exemple le  
30 promoteur du gène de la villine, présente un intérêt car permettent une expression tissu spécifique (limitée à l'intestin dans le cas de la villine).

Par ailleurs, les séquences d'expression peuvent également être modifiées, par exemple pour les adapter à l'expression dans un type particulier de vecteur ou de cellule, pour réduire leur taille, pour augmenter leur activité de promoteur de la transcription, pour générer des promoteurs inductibles, améliorer leur niveau de régulation, ou encore changer la nature de leur régulation. De telles modifications peuvent être effectuées par exemple par mutagenèse *in vitro*, par introduction d'éléments additionnels de contrôle ou de séquences synthétiques, ou par des délétions ou des substitutions des éléments originels de contrôle. Il peut être particulièrement avantageux d'utiliser des promoteurs tissu-spécifiques, afin de cibler l'expression de la PIL dans un type seulement de tissu.

Par ailleurs, lorsque la séquence d'acides nucléiques ne comporte pas de séquences d'expression, celle-ci peut être incorporée dans un vecteur d'expression, en aval d'une telle séquence.

Pour préparer un vecteur selon l'invention, il convient, dans un premier temps, d'identifier une fonction cellulaire, par exemple impliquée dans ou responsable d'une pathologie, sur laquelle on désire agir. Ensuite, il convient d'identifier un composant cellulaire approprié impliqué dans cette fonction, puis de déterminer quel PIL semble le plus adapté à ce composant (anticorps, dérivés, etc), en fonction de sa localisation, de son rôle, de sa nature, etc. Le PIL ayant été sélectionné, une séquence d'acides nucléiques correspondante peut être obtenue par les techniques de biologie moléculaire (synthèse chimique, clonage, modification enzymatique, etc), et insérée dans un vecteur appropriée selon la méthodologie décrite dans les exemples.

Un autre objet de l'invention concerne des compositions pharmaceutiques comprenant au moins une séquence d'acides nucléiques ou un vecteur tels que définis précédemment.

Les séquences de l'invention peuvent être utilisées telles quelles, par exemple après injection à l'homme ou l'animal, pour induire l'expression intracellulaire d'une PIL en vue d'affecter une fonction cellulaire déterminée. En particulier, elles peuvent être injectées sous forme d'ADN nu selon la technique décrite dans la demande WO 90/11092. Elles peuvent également être administrées sous forme complexée, par exemple avec du DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), avec des protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), avec des lipides (Felgner

et al., PNAS 84 (1987) 7413), sous forme de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc.

5 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les séquences nucléiques telles que définies précédemment sont incorporées dans un vecteur. L'emploi de tels vecteurs permet en effet de favoriser la pénétration dans les cellules, d'accroître la résistance aux enzymes, et d'augmenter la stabilité et les niveaux d'expression intracellulaires. Les vecteurs de l'invention peuvent être aussi bien plasmidiques que viraux. Cependant, on préfère utiliser un vecteur viral.

10 Dans un mode de réalisation préféré, l'invention concerne donc des séquences d'acides nucléiques telles que définies précédemment incorporées à un vecteur viral. L'invention concerne également tout virus recombinant comprenant, inséré dans son génome, au moins une séquence d'acides nucléiques codant pour une PIL.

15 Comme indiqué plus haut, différents virus sont susceptibles d'être utilisés comme vecteurs pour le transfert et l'expression in vivo de gènes selon l'invention. A titre d'exemple, on peut citer les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, les adénovirus, le virus de la vaccine etc.

20 Avantageusement, le virus recombinant selon l'invention est un virus défectif. Le terme "virus défectif" désigne un virus incapable de se répliquer dans la cellule cible. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la répllication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par les séquences nucléiques de l'invention. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

25 Des virus recombinants défectifs dérivés de rétrovirus, de virus adéno-associés, du virus HSV (herpes simplex virus) ou des adénovirus ont déjà été décrits dans la littérature [Roemer et Friedmann, Eur. J. Biochem. 208 (1992) 211; Dobson et al., Neuron 5 (1990) 353; Chiocca et al., New Biol. 2 (1990) 739; Miyanohara et al., New Biol. 4 (1992) 238; WO91/18088; Akli et al., Nature Genetics 3 (1993) 224; Stratford-Perricaudet et al., Human Gene Therapy 1 (1990) 241; EP 185 573, Levvero et al., Gene 101 (1991) 195; EP 243204]].

Il est particulièrement avantageux d'utiliser les séquences nucléiques de l'invention sous forme incorporée à un adénovirus recombinant défectif.

Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui ne sont pas pathogènes pour l'homme, et notamment les sujets non immuno-déprimés. Par ailleurs, ces virus ne s'intègrent pas dans le génome des cellules qu'ils infectent, et peuvent incorporer des fragments importants d'ADN exogène. Parmi les différents sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5). Dans le cas des adénovirus Ad 5, les séquences nécessaires à la réplication sont les régions E1A et E1B.

Par ailleurs, la faible taille des gènes codant pour les anticorps intracellulaires selon l'invention permet de manière avantageuse d'incorporer simultanément, dans un même vecteur, plusieurs gènes codant pour des anticorps intracellulaires dirigés contre des régions différentes d'un ou de plusieurs composants cellulaires ciblés. Un mode de réalisation particulier de l'invention consiste donc dans un vecteur, notamment viral, comprenant au moins deux séquences d'acides nucléiques codant pour des protéines intracellulaires de liaison dirigées contre des épitopes différents.

Les virus recombinants défectifs de l'invention peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un virus défectif et un plasmide portant entre autre la séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-avant (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Graham, EMBO J. 3(12) (1984) 2917). La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits virus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome du virus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation d'adénovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). A titre d'exemple de lignée utilisable pour la préparation de rétrovirus recombinants défectifs, on peut mentionner la lignée CRIP (Danos et Mulligan, PNAS 85 (1988) 6460).

Ensuite, les virus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

La présente invention concerne donc également une composition pharmaceutique comprenant au moins un virus recombinant défectif tel qu défini précédemment.



Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc.

Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des  
5 véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la  
10 constitution de solutés injectables.

Les doses d'acides nucléiques (séquence ou vecteur) utilisées pour l'administration peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière  
15 générale, concernant les virus recombinants selon l'invention, ceux-ci sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu/ml, et de préférence  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules  
20 infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

L'invention a également pour objet toute cellule recombinante comprenant une séquence d'acides nucléiques telle que définie ci-avant.

Les séquences de l'invention, éventuellement incorporées à des vecteurs, et  
25 les compositions pharmaceutiques les contenant peuvent être utilisées pour le traitement de nombreuses pathologies. Elles peuvent donc être utilisées pour le transfert et l'expression de gènes in vivo dans tout type de tissu. Le traitement peut d'ailleurs être ciblé en fonction de la pathologie à traiter (le transfert au niveau d'un tissu particulier peut notamment être déterminé par le choix d'un vecteur, et  
30 l'expression par le choix d'un promoteur particulier). Les séquences ou vecteurs de l'invention sont avantageusement utilisées pour la production chez l'homme ou l'animal, in vivo et de manière intracellulaire, de protéines capables d'agir de manière spécifique sur des fonctions cellulaires diverses telles que la prolifération cellulaire, la

synthèse de métabolites, la synthèse de protéines, la réplication et/ou la transcription de l'ADN, etc. La présente invention permet ainsi de traiter de manière spécifique, locale et efficace, de nombreux dysfonctionnements cellulaires à l'origine ou résultant de différentes pathologies, et en particulier les cancers, maladies virales ou bactériennes, ou, plus généralement, toute pathologie dans laquelle un médiateur cellulaire peut être identifié.

#### Utilisation pour le traitement de pathologies liées à la prolifération cellulaire

Dans un mode particulièrement avantageux, les séquences d'acides nucléiques de l'invention comprennent des gènes codant pour des PIL capables d'interagir et d'interférer avec l'activité de facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire. La prolifération cellulaire met en jeu une multitude de facteurs, tels que des récepteurs membranaires (protéines G), des oncogènes, des enzymes (protéines kinases, farnésyl transférases, phospholipases, etc) des nucléosides (ATP, AMP, GDP, GTP, etc) des facteurs d'activation [facteurs d'échange des guanosines (GRF, GAP, etc), facteurs transcriptionnels, etc], etc. L'expression intracellulaire de PIL selon l'invention capables de lier et de neutraliser de tels facteurs permet de contrôler le processus de prolifération cellulaire. Ceci est particulièrement intéressant dans les situations où la prolifération cellulaire échappe aux mécanismes naturels de régulation, conduisant par exemple à l'apparition de tumeurs. De nombreux facteurs (produits des gènes oncogènes et facteurs impliqués dans la signalisation de l'effet des ces produits) ont en effet été associés à ces phénomènes de dérégulation de la prolifération cellulaire. Ainsi, 90 % des adénocarcinomes du pancréas présentent un oncogène Ki-ras muté sur le douzième codon (Almoguera et coll., Cell 53 (1988) 549). De même, la présence d'un gène ras muté a été mise en évidence dans les adénocarcinomes du colon et les cancers de la thyroïde (50 %), ou dans les carcinomes du poumon et les leucémies myéloïdes (30 %, Bos, J.L. Cancer Res. 49 (1989) 4682). De nombreux autres oncogènes ont aujourd'hui été identifiés (myc, fos, jun, ras, myb, erb, etc), dont des formes mutées semblent responsables d'un dérèglement de la prolifération cellulaire.

L'expression de PIL capables de lier ces facteurs cellulaires (préférentiellement leur forme oncogénique) et donc de ralentir ou d'inhiber leurs effets offre la possibilité d'une nouvelle approche thérapeutique des cancers.

Dans un mode particulièrement intéressant, la présente invention concerne des vecteurs contenant des séquences d'acides nucléiques comprenant un gène codant

pour un anticorps intracellulaire capable d'interagir avec le produit d'expression d'un oncogène ou avec un facteur intervenant dans la voie de signalisation d'un oncogène.

Parmi les oncogènes cibles, on peut citer au sens de l'invention les oncogènes ras, fos, jun, myc, myb et erb.

5            Parmi les facteurs intervenant dans la voie de signalisation d'un oncogène, on peut citer notamment les récepteurs membranaires, qui peuvent être ciblés au niveau de leurs domaines intracellulaires [protéines G, kinases (exemple : tyrosine kinase), phosphorylases, farnésyl transférases], les facteurs d'échange des nucléosides (facteurs GAP, GRF, etc), etc.

10           Plus préférentiellement, la présente invention concerne des vecteurs, notamment d'origine virale, contenant une séquence d'acides nucléiques codant pour un anticorps intracellulaire dirigé contre un oncogène ou un facteur intervenant dans la voie de signalisation d'un oncogène, constitué d'un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne légère d'un anticorps relié par un linker  
15           peptidique à un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne lourde d'un anticorps.

Plus particulièrement, l'invention concerne des virus recombinants défectifs exprimant un anticorps intracellulaire dirigé contre un facteur de la voie de signalisation ras-dépendante.

20           Comme le montrent les exemples, l'expression d'anticorps intracellulaires anti-p21 (produit d'expression du gène ras), anti-GAP, ou anti-p53 permet de réverter le phénotype transformant d'une cellule cancéreuse.

#### Utilisation pour le traitement de pathologies virales

25           Les séquences nucléiques selon l'invention peuvent encore être des séquences codant pour des anticorps intracellulaires capables d'interagir avec le cycle infectieux d'un virus pathogène (HIV, virus du papillome, etc).

30           Plus particulièrement, dans le cas du virus HIV, les agents antiviraux actuellement disponibles ou dans des protocoles de phases cliniques avancées ne permettent pas de bloquer le virus dans sa multiplication, mais tout juste de freiner la progression de la maladie. Une des principales raisons à cela réside dans l'apparition de souches résistantes à ces antiviraux. Le développement d'une vaccination efficace se heurte également à de nombreux obstacles : La variabilité génétique du HIV ne permet pas de définir une structure antigénique stable pour donner lieu à une réponse immunologique humorale ou cellulaire contre les différentes souches existantes.

Comme dans le cas des antiviraux où le virus résiste à une pression de sélection par le biais de mutations ponctuelles, dans les essais de vaccination tentés à ce jour, le HIV semble échapper au système immunitaire.

La présente invention constitue une nouvelle approche pour le traitement de l'infection par HIV, consistant à bloquer le virus lors de son cycle réplcatif par expression de PIL, et notamment d'anticorps intracellulaires. La présente invention permet en particulier de s'affranchir du problème de variabilité génétique du virus contrairement aux approches vaccinales et antivirales. Dans le cas de la vaccination classique, les réponses immunitaires mises en évidence ont principalement lieu contre des régions variables. Au contraire, l'utilisation d'anticorps intracellulaires selon l'invention permet de choisir un épitope non seulement conservé mais également indispensable à la fonction d'une protéine virale. De préférence, l'anticorps intracellulaire est dirigé contre un épitope d'une taille suffisante pour empêcher le virus de résister et de s'adapter par le biais de mutations ponctuelles. Par ailleurs, la faible taille du gène codant pour l'anticorps intracellulaire selon l'invention permet de manière avantageuse de cibler plusieurs régions (d'une seule ou de plusieurs protéines) à partir d'un même vecteur de thérapie génique.

Les deux principales protéines de régulation du virus, tat et rev, sont des cibles de première importance pour la mise en oeuvre de la présente invention. En effet, ces deux protéines sont indispensables pour la réplication virale. De plus, l'expression d'ARN messagers anti-sens ou de ribozymes ciblant l'ARN messenger tat ou rev empêche la réplication virale. Le mécanisme d'action de ces protéines est relativement bien documenté : tat est un facteur de transactivation de la transcription tandis que rev assure la transition entre les phases précoce et tardive du cycle réplcatif. Ces deux protéines exercent leur activité en se fixant sur les ARN messagers viraux, et la région peptidique nécessaire à cette fixation, indispensable pour leur fonction, est relativement bien délimitée. En outre, il a été montré que la surexpression de leur site de fixation sur l'ARN (région TAR pour tat et RRE pour rev) inhibe leur fonction sur l'expression virale.

Dans ces conditions, un mode particulièrement avantageux de l'invention réside dans l'utilisation d'une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire dirigé contre les protéines tat ou rev et capable de neutraliser leur activité. Avantageusement, de tels anticorps sont dirigés contre la région de tat ou rev responsable de leur fixation sur l'ARN.

Des anticorps intracellulaires selon l'invention dirigés contre ces épitopes peuvent être préparés selon la méthodologie décrite dans les exemples. En particulier, concernant l'anticorps anti-tat, il peut être obtenu par modification génétique à partir de l'anticorps monoclonal T-B (12) (Hybridolab).

5 Une autre protéine cible importante dans la réplication du HIV dont la fonction peut être facilement inhibée par un anticorps intracellulaire est la protéine de la nucléocapside NCP7. En effet, cette protéine joue un rôle important dans la rétro-transcription (phase précoce), dans l'intégration, et dans une phase tardive mais néanmoins importante : l'encapsidation. Cette multifonctionnalité s'explique par le fait  
10 qu'elle a un rôle structural enzymatiquement actif. Elle a été décrite comme une hybridase qui permettrait la complexation des acides nucléiques viraux : ARN/ADN et ADN/ADN pendant la rétro-transcription ainsi que ARN/ARN et ARN/ARNt-lys3 au niveau de l'encapsidation. NCP7 apparaît indispensable pour la production de virus infectieux.

15 L'expression cytoplasmique par thérapie génique d'anticorps intracellulaires dirigés contre la NCP7 inhibant sa fonction dans la dimérisation des ARN viraux et dans l'encapsidation constitue un autre mode particulier de mise en oeuvre de l'invention.

20 Des anticorps intracellulaires selon l'invention dirigés contre des épitopes neutralisants de cette protéine peuvent être préparés selon la méthodologie décrite dans les exemples.

D'autres composants viraux peuvent également faire l'objet d'une thérapie génique selon l'invention, et notamment : le site de fixation à la molécule CD4 (exemple : la glycoprotéine d'enveloppe (gp120/41)), la région de multimérisation de  
25 l'enveloppe, le site de clivage gp120/gp41, la protéase, l'intégrase, et plus généralement toute protéine virale. Ces domaines ne sont généralement pas accessibles quand l'enveloppe est sous forme native. Pour cette raison, ils sont très peu immunogènes et une vaccination les mettant en jeu est impossible. La présente invention permet de cibler ces composants viraux, et possède ainsi un potentiel  
30 thérapeutique très supérieur. En outre, comme indiqué plus haut, la faible taille des gènes codant pour l'anticorps intracellulaire selon l'invention permet de manière avantageuse d'exprimer simultanément, dans un même vecteur plusieurs anticorps intracellulaires dirigés contre des régions différentes d'une ou de plusieurs de ces cibles.

Les séquences nucléiques selon l'invention peuvent également être des séquences codant pour des PIL capables d'interagir et d'interférer avec l'activité de facteurs impliqués dans la synthèse de métabolites, dans la synthèse protéique ou encore dans la réplication et/ou transcription de l'ADN.

- 5           La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

### **Légende des figures**

- Figure 1** : Effet neutralisant de l'expression transitoire d'un anticorps intracellulaire de l'invention sur le pouvoir transformant d'un oncogène ras ou Her2. Py = cellules  
10    contrôle; ScFv = cellules transectées par le plasmide psv2.ScFv.ras seul, VAL = cellules transectées par le vecteur exprimant ras oncogénique Ha-ras Val12; VAL+ScFv = cellules cotransectées par le plasmide psv2.ScFv.ras et Ha-ras Val12; HER2 = cellules transectées par le vecteur exprimant Her2 oncogénique; HER2+ScFv = cellules cotransectées par le plasmide psv2.ScFv.ras et par Her2.

### **15   Techniques générales de biologie moléculaire**

- Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au  
20    phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in  
25    Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

- Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un  
30    mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. **13** (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science **230** (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. **155** (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74** (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

### Exemple 1 : Clonage et expression d'une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire anti-ras

Cet exemple décrit le clonage et l'expression d'une séquence d'acides nucléiques codant pour protéine intracellulaire de liaison reproduisant les propriétés de l'anticorps monoclonal Y13-259. L'anticorps Y13-259 est dirigé contre les protéines Ras (ref. ATCC CRL 1742) (J. Virol. **43**, 294-304, 1982), et est un anticorps neutralisant sur la fonction des protéines Ras oncogéniques une fois injecté dans les cellules [Smith et coll., (1986) Nature, **320**, 540-543 ; Kung et coll., Exp. Cell. Res. (1986) **162**, 363-371].

#### **1.1. Préparation de la séquence d'ADN**

Une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire (fragment ScFv) a été préparée selon la technique décrite dans le brevet US 4,946,778. Cette séquence a ensuite été placée sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans les cellules mammifère.

Les ARN poly A sont isolés à partir d'une culture cellulaire de l'hybridome qui sécrète l'anticorps Y13-259 selon la technique décrite par Chirguin S.H. et al. [Biochemistry 18, 5294 (1979)]. Ces ARN sont utilisés pour une réaction de Reverse-Transcription à l'aide de primers formés d'hexanucléotides aléatoires. Les ADNc obtenus servent de matrice à deux réactions de PCR :

- l'une destinée à amplifier le fragment variable de la chaîne lourde (VH) de Y13-259 avec des primers spécifiques de VH murins,
- la seconde permettant d'obtenir le fragment VL en utilisant un mélange de 10 primers dérivés des séquences murines.

Deux fragments de 340 pb et 325 pb sont ainsi obtenus et ensuite assemblés grâce à un linker qui permet un positionnement correct du cDNA de VH en 5' de celui de VL. Ce linker code pour 15 acides aminés formés de trois répétitions du motif (Gly)<sub>4</sub> Ser [Orlandi, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833-3837 (1979)]. Cette séquence confère assez de degrés de liberté à la fusion VH-VL pour permettre leur assemblage en orientation parallèle et assurer une affinité correcte pour l'antigène.

La séquence d'acides nucléiques fusionnée VH-linker-VL est ensuite insérée dans un phagemide qui permet l'expression de l'anticorps intracellulaire (fragment ScFv) à la surface d'un phage M13. Cette expression permet facilement l'identification et la sélection des anticorps intracellulaires qui reconnaissent correctement l'antigène.

## 1.2. Evaluation fonctionnelle de l'anticorps intracellulaire modifié.

La séquence d'ADN qui code pour l'anticorps intracellulaire modifié anti-Ras (VH-linker-VL) est isolée du phagemide par restriction, puis insérée dans le vecteur sv2 sous contrôle du couple enhancer promoteur précoce de SV40 (Schweighoffer et al. Science, 256, 825-827, 1992), afin de tester sa capacité à antagoniser les effets d'un Ras oncogénique. Le plasmide ainsi obtenu est désigné psv2.ScFv.ras. L'évaluation fonctionnelle a été effectuée selon plusieurs tests :

### a) Transfection transitoire dans les cellules mammifères.

Pour l'évaluation par transfection transitoire dans les cellules mammifères, le plasmide psv2.ScFv.ras a été cotransfecté dans les cellules NIH 3T3 selon le protocole décrit dans Schweighoffer et al. [Science, 256, 825-827 (1992)] avec un vecteur qui permet l'expression d'un gène Ha-ras Val 12. L'état d'activation de la voie de



signalisation étudiée a été enregistré par mesure de l'activité enzymatique obtenue à partir du gène rapporteur "chloramphenicol-acetyl transferase (CAT)" placé sous le contrôle d'un promoteur contenant éléments nucléotidiques répondant en "trans" à l'action de Ras (RRE) également cotransfectés : ces éléments RRE sont constitués par un promoteur hybride TK-enhancer du polyome (Wasylyk et coll., EMBO, J. 7, 2475, 1988).

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 1. L'analyse des activités CAT obtenue démontre la capacité de l'anticorps intracellulaire modifié, préparé à partir de l'anticorps Y13-259, d'antagoniser l'activité du Ras oncogénique.

Le plasmide psv2.ScFv.ras cotransfecté avec un plasmide permettant l'expression d'un oncogène doué d'activité tyrosine kinase, l'oncogène HER2 (human epidermal growth factor type II) bloque également son activité sur le plasmide "CAT" test (figure 1).

b) Formation de foyers de cellules transformées : Les cellules cancéreuses ont la propriété de former des foyers de transformation et notamment les fibroblastes NIH 3T3 exprimant un Ras oncogénique (Barlat et coll., Oncogene (1993), B, 215-218).

Les cellules NIH 3T3 sont cultivées comme dans le test précédent dans un milieu Dulbecco modifié Eagle (DMEM) contenant 10 % de sérum de veau fœtal, à 37°C dans un environnement humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Ces cellules sont ensuite co-transfectées avec un Ras oncogénique : Ha-ras Val12, le plasmide psv2.ScFv.ras (Cf a) ci-dessus), et un excès de 10 fois du gène de résistance à la néomycine, par la technique de transfection aux lipides cationiques (Schweighoffer et coll. Science, 256, 825-827, 1992). La même quantité totale d'ADN est transfectée pour chaque boîte.

24 heures après la transfection, les cellules transfectées provenant de chaque boîte de pétri de 100 mm sont divisées dans un rapport 1 à 10 et cultivées dans le même milieu mais en présence de G418 (GIBCO/BRL) à 0,4 mg par ml de milieu. Le nombre de foyers de transformation obtenu par µg d'ADN transfecté est comptabilisé après 14 jours de culture.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous. Ils représentent la moyenne de quatre essais indépendants.

**TABLEAU**

Transformation de cellules NIH 3T3 par Ha-ras Val12 en présence d'anticorps intracellulaire anti-ras

Plasmides transfectés	Nombre de foyers par µg d'ADN transfecté
Ha-Ras Val12	110
psv2.ScFv.ras	2
Ha-Ras Val12 + psv2.ScFv.ras	30

5 Les résultats obtenus montrent clairement que l'anticorps intracellulaire anti-ras diminue très fortement le pouvoir transformant d'un gène ras oncogénique.

Par ailleurs, vu les résultats obtenus en a), l'expression de ce fragment ScFv de l'anticorps Y13-159 devrait également empêcher la transformation par d'autres oncogènes tel HER1, HER2 facilitant l'activation des protéines Ras cellulaires.

10 Il est entendu que l'homme du métier peut, sur la base des résultats décrits dans la présente demande, reproduire l'invention avec des séquences d'acides nucléiques codant pour des anticorps intracellulaires (tels que des fragments ScFv) dirigés contre d'autres composants cellulaires. Ceux-ci peuvent être préparés soit à partir d'anticorps connus dirigés contre des composants cellulaires, soit par

15 identification d'un antigène à neutraliser, immunisation au moyen de cet antigène ou d'un épitope préféré de celui-ci, puis préparation de l'anticorps intracellulaire à partir de l'anticorps, de son ARNm, ou de hybridome obtenus. D'autres composants impliqués dans des processus de transformation cellulaire peuvent ainsi être ciblés. Par exemple, d'autres séquences d'ADN codant pour des anticorps intracellulaires de liaison

20 anti-ras peuvent être préparées selon la même méthodologie, à partir des hybridomes M38, M8, M70, M90 et M30 (ATCC HB 9158), dont les anticorps sont dirigés respectivement contre les résidus 1 à 23, 24 à 69, 90 à 106, 107 à 130 et 131 à 152 de la protéine Ha-Ras. De plus, comme indiqué plus haut, des vecteurs portant simultanément plusieurs séquences codant pour différents anticorps intracellulaires

25 peuvent être avantageusement préparés, pour conférer une activité neutralisante supérieure.

### Exemple 2 : Clonage et expression d'une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire anti-GAP

Cet exemple décrit le clonage et l'expression d'une séquence d'acides nucléiques codant pour une protéine intracellulaire de liaison reproduisant les propriétés d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine GAP.

La protéine GAP (pour GTPase Activating Protein) est impliquée dans la voie de signalisation ras-dépendante. Elle interagit avec les protéines ras de manière catalytique et multiplie par 100 à 200 la vitesse d'hydrolyse du GTP mesurée *in vitro* pour la protéine p21 normale. Différents travaux ont montré que le domaine catalytique de cette protéine de 1044 acides aminés environ était situé dans la région carboxy-terminale (résidus 702-1044), et que cette région était responsable de l'interaction de la protéine GAP avec les protéines ras (Cf WO91/02749).

Il a maintenant été montré qu'un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine dit "SH3" de la protéine GAP neutralisait les fonctions des protéines Ras oncogéniques dans l'oeuf de Xénope (Duchesne et coll., Science, 259, 525-528, 1993).

Selon la méthodologie décrite en 1.1., il est possible de synthétiser une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire (fragment ScFv) correspondant à cet anticorps. Une telle séquence, incorporée à un vecteur peut permettre d'inhiber le pouvoir transformant d'un gène ras oncogénique dans les cellules tumorales.

Par ailleurs, la demanderesse a également identifié plus précisément les épitopes reconnus par cet anticorps. Ces épitopes ont ensuite été synthétisés artificiellement, et peuvent être utilisés pour générer de nouveaux anticorps neutralisants pouvant servir à la mise en oeuvre de l'invention.

a) Identification plus précise :

L'identification a été réalisée par la technique "d'épitope scanning". Cette technique est basée sur le principe qu'un anticorps donné peut réagir avec des peptides de 5 à 15 acides aminés. De ce fait, l'identification d'épitopes séquentiels peut être obtenue en préparant un jeu complet de peptides recouvrants, de 5-15 acides aminés, correspondants à la séquence complète de l'antigène considéré. Cette technique a été utilisée pour déterminer les épitopes fonctionnels du domaine "SH3" de GAP. Pour

cela, la totalité de ce domaine a été explorée par recouvrements séquentiels, par synthèse d'un décapeptide tous les 2 acides aminés.

- Synthèse des peptides recouvrants.

35 peptides couvrant la totalité du fragment de la figure 1 ont été synthétisés chimiquement. La synthèse a été effectuée en double, sur 2 supports indépendants, par la méthode Fmoc/t-butyl sur phase solide (kit Cambridge Research Biochemicals).

- Mise en évidence des épitopes fonctionnels.

Les épitopes fonctionnels reconnus par l'anticorps Ac200 ont été révélés en test ELISA par un anticorps de lapin anti-souris couplé à la peroxydase. Le substrat chromogénique de l'enzyme utilisé est l'amino-di-(3-ethylbenzothiazodine sulfonate) (ABTS).

Les résultats obtenus montrent que les épitopes reconnus par cet anticorps sont les suivants :

- PVEDRRRVRAI  
- EISF  
- EDGWM

Ces épitopes peuvent être utilisés selon les techniques classiques de l'homme du métier pour générer des anticorps neutralisant les effets de ras. Ces anticorps ou hybridomes les produisant sont ensuite utilisés pour générer des séquences d'acides nucléiques et des vecteurs de l'invention, selon la méthodologie décrite précédemment.

**Exemple 3 : Préparation d'une séquence d'acides nucléiques codant pour un anticorps intracellulaire anti-Ki-ras à partir d'ARNm extraits de rates de souris immunisées avec des peptides dérivés des parties hypervariables de Ki-Ras (2A et 2B)**

Cet exemple décrit la préparation de séquences d'acides nucléiques codant pour des anticorps intracellulaires (tels que des fragments ScFv) selon l'invention par identification d'un antigène à neutraliser, immunisation au moyen de cet antigène ou d'un épitope préféré de celui-ci, puis préparation de la séquence d'acides nucléiques à partir de l'anticorps, de son ARNm, ou de hybridome obtenus.

Cet exemple démontre la possibilité d'appliquer la présente invention à tout antigène ou épitope désiré, même lorsqu'aucun anticorps monoclonal dirigé contre ledit antigène ou épitope n'est disponible.

L'antigène ciblé dans cet exemple est la protéine Ki-ras. Plus précisément, les  
5 antigènes utilisés pour l'immunisation sont les peptides de 25 et 24 acides aminés correspondant aux extrémités terminales des protéines Ki-Ras 2A et 2B suivants :

- Peptide 2A : QYRLKKISKEEKTGCVKIKKCIIM

- Peptide 2B : KYREKNSKDGKKKKKSKTKCIIM

Après immunisation de souris avec ces peptides, selon les techniques  
10 classiques de l'immunologie, les rates sont extraites et les ADNc sont préparés à partir des ARNm. Les ADNc codant pour les régions variables sont ensuite clonés, ce qui aboutit à la constitution d'une banque de phages exprimant les ScFv correspondant à la totalité du répertoire des souris utilisées. Les anticorps intracellulaires (fragments ScFv) reconnaissant les peptides 2A et 2B sont ensuite identifiés et isolés par des  
15 étapes successives de sélection par affinité sur colonne et sur plaque de microtitration

Ces ScFv sont ensuite testés fonctionnellement selon le protocole décrit dans l'exemple 1.

La stratégie développée dans cet exemple permet d'une manière avantageuse de sélectionner des anticorps intracellulaires spécifiques des oncogènes Ki-Ras, qui  
20 n'affecteront donc pas les autres protooncogènes Ras. La sélectivité de tels outils est donc non seulement cellulaire (du fait du découplage des voies de transduction dans les cellules transformées par Ras) mais aussi moléculaire.

#### **Exemple 4 : Préparation d'une séquence d'acides nucléiques codant pour un anticorps intracellulaire anti-p53 mutées**

25 Cet exemple décrit la préparation de séquences d'acides nucléiques codant pour des anticorps intracellulaires (tels que des fragments ScFv) dirigés contre des protéines p53 mutées. Ces anticorps intracellulaires sont obtenus à partir de différents anticorps monoclonaux dirigés contre lesdites protéines p53 mutées.

30 Le gène codant pour la protéine p53 est altéré dans un très grand nombre de cellules tumorales (Caron de Fromentel et Soussi, Genes, 4, 1-15, 1992). La protéine p53 mutée n'a pas la même conformation que la p53 sauvage (Lane et Benchimol, Genes Dev. 4, 1-8, 1990). Ce changement de conformation peut être détecté par des

anticorps monoclonaux (Milner et Cook, Virology, 154, 21-30, 1986 ; Milner, Nature, 310, 143-145, 1984).

Les anticorps pAB 240 reconnaissent les formes mutées des protéines p53.

L'expression intracellulaire de fragment ScFv d'anticorps spécifiques de p53  
5 mutée ou de protéines interagissant spécifiquement avec ces protéines p53 mutées  
devrait induire un effet bénéfique dans les tumeurs présentant une p53 mutée.

**Exemple 5 : Clonage et expression d'une séquence d'ADN codant pour un anticorps intracellulaire anti-virus du papillome**

Cet exemple décrit le clonage et l'expression d'une séquence d'ADN codant  
10 pour un anticorps intracellulaire (fragment ScFv) dirigé contre une protéine du virus  
du papillome humain (HPV).

La protéine virale ciblée est la protéine E6. Cette protéine est produite par les  
virus HPV 16 et 18, qui sont responsables de 90 % des cancers du cervix chez la  
femme et ont été identifiés dans des lésions épithéliales pré-cancéreuses (Riou et al.,  
15 Lancet 335 (1990) 117). Le produit du gène E6 conduit à la formation de tumeurs en  
diminuant fortement la quantité de p53 sauvage, un anti-oncogène, dans les cellules  
HPV-positives (Wrede et al., Mol. Carcinog. 4 (1991) 171). Dans d'autres tumeurs,  
p53 est inhibée par des mécanismes différents : mutation (Cf exemple 4) ou  
association avec des protéines telles que MDM2.

20 La séquence de la protéine E6 a été décrite dans la littérature (Hawley-Nelson  
et al., EMBO J. 8 (1989) 3905; Münger et al., J. Virol. 63 (1989) 4417). Des régions  
particulières de cette protéine peuvent être identifiées par "epitope scanning" (Cf  
exemple 2) puis utilisées pour immuniser des souris selon le protocole décrit dans  
l'exemple 3. La séquence d'ADN codant pour l'anticorps intracellulaire (fragment  
25 ScFv) dirigé contre la protéine E6 du virus du papillome humain (HPV) est ensuite  
préparée selon la méthodologie décrite précédemment. La fonctionnalité de cette  
séquence est démontrée après expression in vivo, par mesure :

- de l'augmentation du taux de p53 sauvage dans les cellules exprimant E6
- de la réversion morphologique des cellules transformées par HPV,
- 30 - du blocage des effets de E6 sur la transactivation de p53, et
- de l'inhibition de la transformation par E6 de kératinocytes et de fibroblastes humains.

**Exemple 6 : Préparation d'une séquence d'acides nucléiques codant pour un anticorps intracellulaire anti-HIV à partir d'ARNm extraits de rates de souris immunisées avec des peptides dérivés des régions actives des protéines tat, rev et NCP7.**

5 Cet exemple décrit la préparation de séquences d'acides nucléiques codant pour des anticorps intracellulaires selon l'invention (tels que des fragments ScFv), par identification d'un antigène à neutraliser, immunisation au moyen de cet antigène ou d'un épitope préféré de celui-ci, puis préparation de la séquence d'acides nucléiques à partir de l'anticorps, de son ARNm, ou de hybridome obtenus.

10 Cet exemple démontre encore la possibilité d'appliquer la présente invention à tout antigène ou épitope désiré, même lorsqu'aucun anticorps monoclonal dirigé contre ledit antigène ou épitope n'a été décrit dans l'art antérieur.

Les antigènes ciblés dans cet exemple sont les protéine tat, rev et NCP7 du virus HIV. Plus précisément, les antigènes utilisés pour l'immunisation sont les  
15 peptides suivants de 6, 9 et 16 acides aminés, correspondants aux régions de ces protéines responsables de leur interaction avec les ARNm (pour tat et rev) ou de la dimérisation des ARN (pour NCP7) :

- Peptide tat : RKKRRQRRR
- Peptide rev : RQARRNRRRRWRERQR
- 20 - Peptide NCP7 : RAPRKK

Après immunisation de souris avec ces peptides, selon les techniques classiques de l'immunologie, les rates sont extraites et les ADNc sont préparés à partir des ARNm. Les ADNc codant pour les régions variables sont ensuite clonés, ce qui aboutit à la constitution d'une banque de phages exprimant les ScFv correspondant à la  
25 totalité du répertoire des souris utilisées. Les anticorps intracellulaires (fragments ScFv) reconnaissant les peptides tat, rev et NCP7 sont ensuite identifiés et isolés par des étapes successives de sélection par affinité sur colonne et sur plaque de microtitration

Ces ScFv sont ensuite testés fonctionnellement pour leur capacité à bloquer le  
30 cycle réplcatif du virus HIV.

## REVENDICATIONS

1. Séquence d'acides nucléiques comprenant un gène codant pour une protéine intracellulaire de liaison (PIL) sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans les cellules mammifère.
- 5        2. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle code pour une PIL agissant sur la prolifération cellulaire, sur la synthèse de métabolites, sur la synthèse protéique, sur la réplication et/ou la transcription de l'ADN, ou sur le cycle d'infection d'un virus.
- 10       3. Séquence d'acides nucléiques selon les revendications 1 ou 2 caractérisée en ce que la PIL est un anticorps intracellulaire ou un fragment et/ou dérivé d'un tel anticorps.
4. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 3 caractérisée en ce que la PIL est un fragment Fab ou F(ab)'<sub>2</sub> d'anticorps.
- 15       5. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 3 caractérisée en ce que la PIL est un peptide comprenant au moins un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne légère d'un anticorps relié par un linker peptidique à un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne lourde d'un anticorps.
- 20       6. Séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce que le promoteur fonctionnel dans les cellules mammifère est choisi parmi les promoteurs viraux, cellulaires ou artificiels.
7. Séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce qu'elle est incorporée dans un vecteur.
- 25       8. Séquence d'acides nucléiques selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'elle est incorporée dans un vecteur viral.
9. Virus recombinant défectif comprenant dans son génome une séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 8.



10. Virus recombinant défectif selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associés, le virus de la vaccine et le virus HSV.

5 11. Virus recombinant défectif caractérisé en ce qu'il comporte dans son génome une séquence d'acides nucléiques comprenant un gène au moins codant pour un anticorps intracellulaire ou un fragment et/ou dérivé d'un tel anticorps.

10 12. Virus recombinant défectif selon la revendication 11 caractérisé en ce que l'anticorps intracellulaire est un peptide comprenant au moins un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne légère d'un anticorps relié par un linker peptidique à un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne lourde d'un anticorps.

13. Virus recombinant défectif selon la revendication 11 ou 12 caractérisé en ce que l'anticorps intracellulaire est un anticorps dirigé contre un composant de la cellule cible impliqué dans la prolifération cellulaire.

15 14. Virus recombinant défectif selon la revendication 13 caractérisé en ce que l'anticorps intracellulaire est un anticorps dirigé contre un oncogène ou contre un facteur de la voie de signalisation d'un oncogène.

15. Virus recombinant défectif selon la revendication 14 caractérisé en ce que l'oncogène est choisi parmi les oncogènes myc, myb, ras, fos, jun et erb.

20 16. Virus recombinant défectif selon les revendications 11 à 15 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les rétrovirus, les adénovirus, les virus adéno-associés, le virus de la vaccine et le virus HSV.

25 17. Vecteur, notamment viral, comprenant au moins deux séquences d'acides nucléiques selon la revendication 1 codant pour des protéines intracellulaires de liaison dirigées contre des épitopes différents d'un ou de plusieurs antigènes.

18. Composition pharmaceutique comprenant au moins une séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 8 ou un virus recombinant selon l'une des revendications 9 à 17.

19. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 8 sous forme de liposome, de complexe avec des protéines nucléaires, des lipides ou du dextran, ou sous forme brute.

5           20. Composition pharmaceutique selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 5.

21. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un virus recombinant selon la revendication 12.

10           22. Composition pharmaceutique selon la revendication 21 caractérisée en ce que le virus recombinant est choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus, ou les virus adéno-associés.

23. Utilisation d'une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 1 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.

15           24. Utilisation d'une séquence d'acides nucléiques selon la revendication 1 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des affections virales.

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 486079  
FR 9307241

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	DE-A-39 15 952 (WERNER, P.) 6 Décembre 1990	1-4, 6-9, 11-14, 17, 19, 21-24
Y	* le document en entier *	5, 10, 15, 16, 20
Y	--- NATURE. vol. 342 , 2 Novembre 1989 , LONDON GB pages 99 - 100 RODWELL, J.D. 'Engineering monoclonal antibodies' * le document en entier *	5, 20
Y	--- NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 21, no. 5 , 11 Mars 1993 , ARLINGTON, VIRGINIA US pages 1081 - 1085 RUSSELL, S.J. ET AL.; 'Retroviral vectors displaying functional antibody fragments.' * le document en entier *	10, 15, 16
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
		C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
16 Février 1994		Nauche, S
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>Δ : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1/1

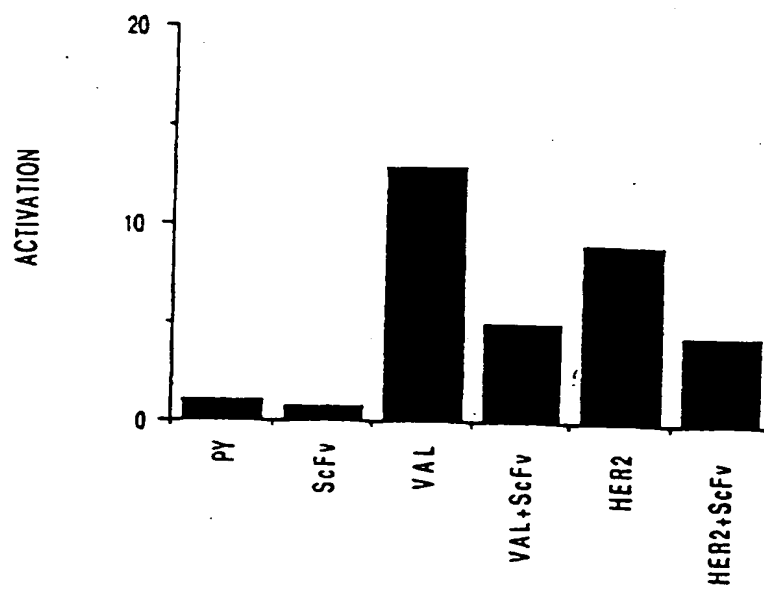


FIGURE 1